

1-29-04

521,764

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 1 月 29 日 (29.01.2004)

PCT

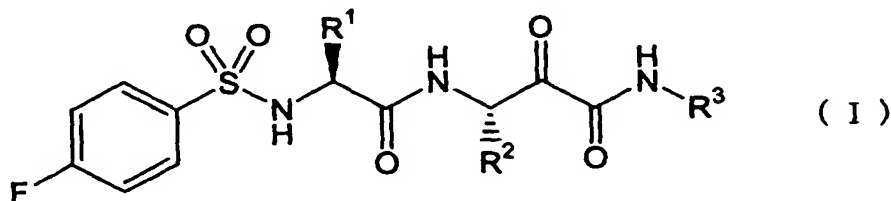
(10) 国際公開番号
WO 2004/009537 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C07C 311/19,
A61K 31/18, A61P 7/02, 9/00, 9/10, 19/02, 19/10, 25/00,
25/28, 27/02, 27/06, 27/12, 37/02, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008878
- (22) 国際出願日: 2003 年 7 月 11 日 (11.07.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-212288 2002 年 7 月 22 日 (22.07.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 千寿製
薬株式会社 (SENJU PHARMACEUTICAL CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒541-0046 大阪府 大阪市 中央区平野町 2 丁
目 5 番 8 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中村 雅之 (NAKA-
MURA, Masayuki) [JP/JP]; 〒651-1141 兵庫県 神戸市

北区泉台 3 丁目 1 6 番地の 1 0 Hyogo (JP). 井上 淳
(INOUE, Jun) [JP/JP]; 〒654-0101 兵庫県 神戸市 須磨
区 白川字 不計 1 番地の 6-6 0 3 号 Hyogo (JP).

- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

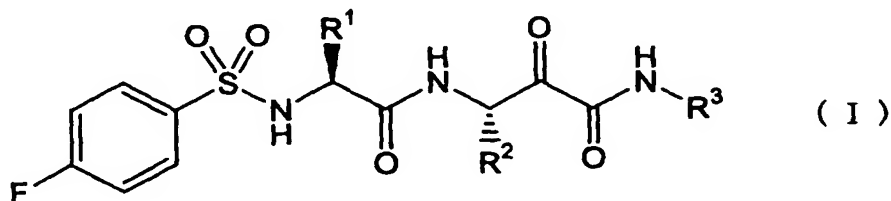
[続葉有]

(54) Title: NOVEL α -KETOAMIDE DERIVATIVE AND USE THEREOF(54) 発明の名称: 新規 α -ケトアミド誘導体およびその用途

(57) Abstract: A compound of the general formula: (I) wherein each of R^1 , R^2 and R^3 represents a lower alkyl group, which compound exhibits a calpain inhibiting activity.

(57) 要約:

カルパイン阻害活性を有する、下記一般式 (I)



[式中、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ低級アルキル基を示す。] で表される化合物を提供する。

WO 2004/009537 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

1

明細書

新規 α -ケトアミド誘導体およびその用途

技術分野

- 5 本発明はカルパイン阻害活性を有する新規 α -ケトアミド誘導体に関する。また、本発明は新規 α -ケトアミド誘導体を含有する医薬に関する。

背景技術

- カルパインは生体内に広く分布する細胞質内のタンパク分解酵素の一つであり、
- 10 カルシウムイオンで活性化される。現在では、このカルパインの異常な活性化が脳卒中、クモ膜下出血、アルツハイマー病、虚血性疾患、筋ジストロフィー、白内障、血小板凝集、関節炎などの種々の疾患に関与していることが明らかとなっている [Trends in Pharmacological Sciences, 15巻, 412頁 (1994年)]。一方、カルパイン阻害剤は水晶体培養による実験的白内障モデルにおいて、水晶体の透明維持に効果があり [Cur.
- 15 Eye Res., 10巻, 657~666頁 (1994年)]、白内障治療剤 (WO 93/23032) などとして有用であることが分ってきている。これまで報告されているカルパイン阻害剤としては、ペプチドハロメタン誘導体 (特公平6-29229)、ペプチドジアゾメタン誘導体 [Biochem. J.,
- 20 253巻, 751~758頁 (1988年)、J. Med. Chem., 35巻, 216~220頁 (1992年)]、ペプチジルアルデヒド誘導体 (EP 0771565、USP 6057290など) などが挙げられるが、これらの阻害剤は、未だ実用化されていないのが現状である。

25

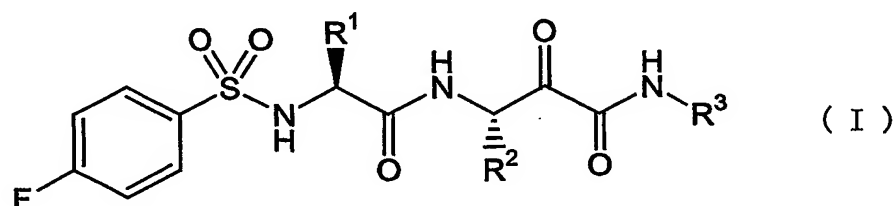
発明の開示

本発明者らは、カルパイン阻害活性を有する化合物を提供すべく鋭意努力した結果、強いカルパイン阻害活性を有する α -ケトアミド誘導体を創製し、さらに

研究を進めて本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

(1) 一般式 (I)



5 [式中、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ低級アルキル基を示す。] で表される化合物、

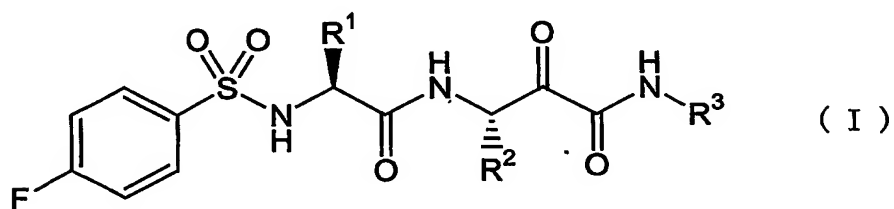
(2) R^1 、 R^2 および R^3 がそれぞれ炭素数3または4のアルキル基である上記

(1) 記載の化合物、

(3) (3S)-N-ブチル-3-((2S)-2-(((4-フルオロフェニル)スルホニル)アミノ)-3-メチルブタノイルアミノ)-5-メチル-2-オキソヘキサナミド、

10

(4) 一般式 (I)

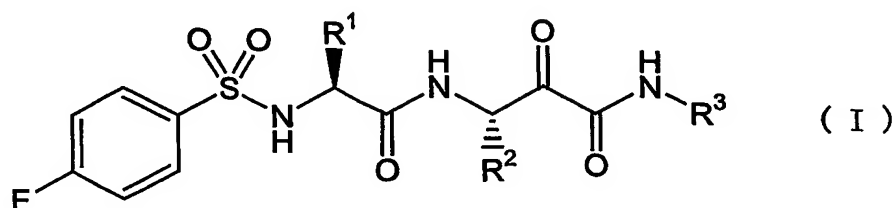


15 [式中、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ低級アルキル基を示す。] で表される化合物を含有する医薬、

(5) カルパイン阻害剤である上記 (4) 記載の医薬、

(6) カルパインが関与する疾患の予防または治療剤である上記 (4) 記載の医薬、

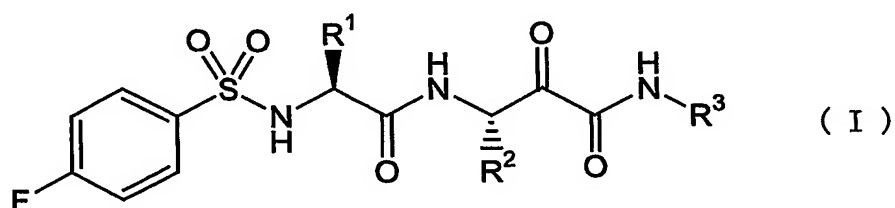
(7) 一般式 (I)



[式中、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ低級アルキル基を示す。] で表される化合物および製薬学的に許容される担体を含む医薬組成物、

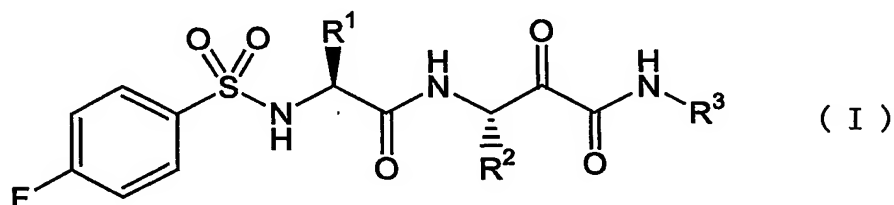
(8) カルパイン阻害剤である上記(7)記載の医薬組成物、

- 5 (9) カルパインが関与する疾患を治療する方法であって、治療を必要とする哺乳動物に有効量の一般式 (I)



[式中、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ低級アルキル基を示す。] で表される化合物を投与することからなる方法、

- 10 (10) カルパイン阻害剤としての一般式 (I)



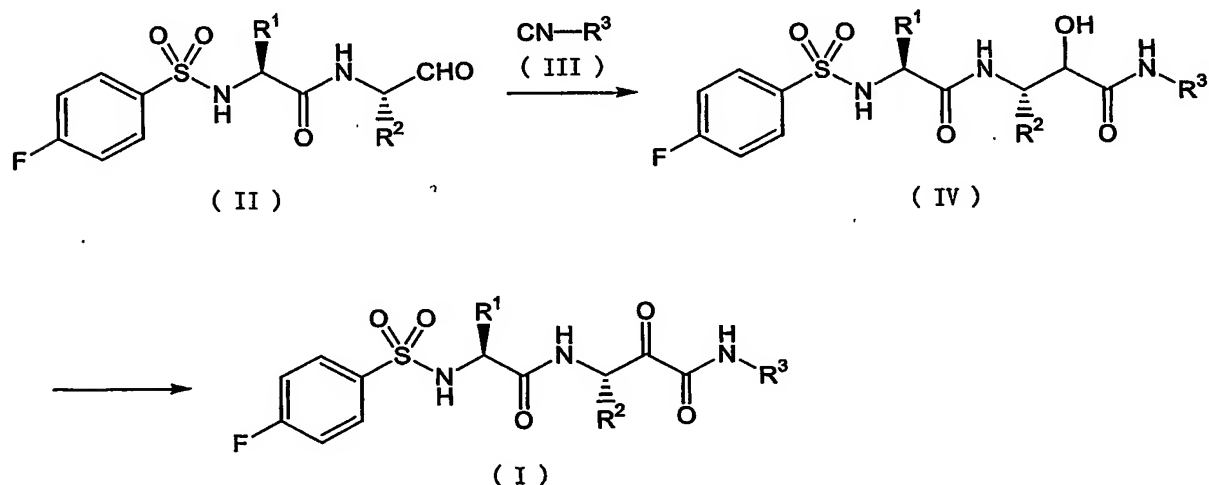
[式中、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ低級アルキル基を示す。] で表される化合物の使用に関する。

- 15 上記一般式 (I) 中、 R^1 、 R^2 および R^3 で表される低級アルキル基としては、炭素数1～6の直鎖状または分枝状アルキル基が好ましく、具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、tert-ペンチル、1-メチルブチル、2-メチルブチル、1,2-ジメチルプロピル、ヘキシル、

1-メチルペンチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、1, 1-ジメチルブチル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、3, 3-ジメチルブチル、1-エチルブチル、2-エチルブチル、1-エチル-2-メチルプロピル、1, 1, 2-トリメチルプロピルが挙げられる。より好ましくは炭素数3または4の直鎖状または分枝状アルキル基である。R¹で表される低級アルキル基としてはイソプロピルが、R²で表される低級アルキル基としてはイソブチルが、R³で表される低級アルキル基としてはブチルが特に好ましい。

さらに、本発明は、本発明化合物 (I) および本発明化合物 (I) の各種の溶媒和や結晶多形の物質ならびにプロドラッグをも包含する。

本発明の化合物は、例えば下記反応式



15 [式中、各記号は前記と同意義を有する。] により製造することができる。

例えばEP 0 771 565号公報またはUSP 6 057 290号公報記載の方法により合成される一般式 (I I) で表されるペプチジルアルデヒド化合物 [以下、化合物 (I I) と記載することもある。] と一般式 (I I I) で表されるイソシアニド試薬 [以下、化合物 (I I I) と記載することもある。] を通常使用
 20 される有機溶媒に溶解し、トリフルオロ酢酸およびピリジンの存在下、P a s s

- erini 反応 [Org. Lett., 2 巻, 2769-2772 頁 (2000 年)] に付すことにより、一般式 (IV) で表される化合物 [以下、化合物 (I V) と記載することもある。] を得ることができる。通常使用される有機溶媒としては、例えばジクロロメタン、N, N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、酢酸エチルなどのような反応に悪影響をおよぼさない慣用の溶媒またはそれらの混合溶媒が挙げられるが、好ましくはジクロロメタンである。イソシアニド試薬の使用量は化合物 (I I) に対して約 1 ~ 約 10 倍モル当量で、好ましくは約 1 ~ 約 2 倍モル当量である。トリフルオロ酢酸の使用量は化合物 (I I) に対して約 1 ~ 約 20 倍モル当量で、好ましくは約 1 ~ 約 3 倍モル当量である。ピリジンの使用量は化合物 (I I) に対して約 1 ~ 約 20 倍モル当量で、好ましくは約 3 ~ 約 5 倍モル当量である。反応温度は、好ましくない副反応が起こらない範囲であれば特に限定されず、通常冷却下、室温または加温下で行われるが、好ましくは氷冷下から室温の範囲である。
- さらに、化合物 (I V) を酸化反応に付することにより、化合物 (I) を得ることができる。該酸化方法としては、例えばクロム酸酸化に分類される二クロム酸ピリジニウム (PDC) 酸化、クロロクロム酸ピリジニウム (PCC) 酸化、ジョーンズ (Jones) 酸化、コリンズ (Collins) 酸化、またはジメチルスルホキシド (DMSO) 酸化に分類されるスワン (Swern) 酸化、DMSO-三酸化硫黄ピリジン錯体による酸化、DMSO-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) による酸化、DMSO-塩化オキサリルによる酸化、またはデスマーチン試薬 (Desse-Martin periodinane) を用いるデスマーチン酸化、次亜ハロゲン酸による酸化、N-ハロゲノカルボン酸アミドによる酸化など、自体公知の方法を使用することができるが、とりわけデスマーチン酸化が好ましい。デスマーチン酸化を用いて酸化する場合は、化合物 (I V) を通常使用される有機溶媒に溶解し、デスマーチン試薬を加えることで行うことができる。通常使用される有機溶媒としては、例えばジクロロ

メタン、N，N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、酢酸エチルなどのような反応に悪影響をおよぼさない慣用の溶媒またはそれらの混合溶媒が挙げらるが、好ましくはジクロロメタンである。デスマーチン試薬の使用量は化合物（I V）

- 5 に対して約 1～約 20 倍モル当量で、好ましくは約 1～約 3 倍モル当量である。反応温度は、好ましくない副反応が起こらない範囲であれば特に限定されず、通常冷却下、室温または加温下で行われるが、好ましくは氷冷下から室温の範囲である。このようにして得られるケトアミド誘導体は公知の分離精製手段、例えば濃縮、減圧濃縮、溶媒抽出、晶出、再結晶、転溶、クロマトグラフィーなどにより単離精製することができる。

上記の方法によって製造される一般式（I）で表される化合物としては、例えば（3 S）-N-ブチル-3-（（2 S）-2-（（4-フルオロフェニル）スルホニル）アミノ）-3-メチルブタノイルアミノ）-5-メチル-2-オキソヘキサナミドなどが挙げられる。

- 15 本発明化合物は文献未載の新規化合物であり、後記試験例に示すように優れたカルパイン阻害活性を有するため、それらを有効成分として、必要により後記の担体等を組み合わせることにより、カルパイン阻害剤としての医薬として有用である。

- 本発明化合物を含有する医薬は、哺乳動物（例えばヒト、ラット、マウス、ウサギ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど）のカルパインが関与する疾患、例えば虚血性疾患、免疫疾患、アルツハイマー病、骨粗鬆症、脳組織障害による疾患、白内障、緑内障、網脈絡膜疾患、光凝固による眼球後眼部合併症（例えば黄斑部浮腫、網膜剥離、視神経炎、視野異常、光覚異常、色覚異常など）、血管新生を伴う疾患などの予防または治療剤として有用である。また、本発明化合物は組織移行性
- 25 および吸収性に優れ、かつ毒性も非常に低く安全性にも優れている。

本発明化合物を含有する医薬は全身的または局所的に投与される。全身的には経口投与の他、静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射など非経口的にも投与される。

局所的には、皮膚、粘膜、鼻内、眼内などに投与される。

- 本発明化合物を含有する医薬の製剤形態としては、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、坐剤などの固形剤、およびシロップ剤、注射剤、点眼剤、点鼻剤などの液剤などが挙げられる。顆粒および錠剤として製造する場合には、例えば賦形剤（乳糖、白糖、ブドウ糖、デンプン、結晶セルロースなど）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウムなど）、崩壊剤（デンプン、カルメロースナトリウム、炭酸カルシウムなど）、結合剤（デンプン糊液、ヒドロキシプロピルセルロース液、カルメロース液、アラビアゴム液、ゼラチン液、アルギン酸ナトリウム液など）などを用いることにより任意の剤形を製造することができる。また、顆粒剤および錠剤には、適当なコーティング剤（ゼラチン、白糖、アラビアゴム、カルナバロウなど）、腸溶性コーティング剤（例えば酢酸フタル酸セルロース、メタアクリル酸コポリマー、ヒドロキシプロピルセルロースフタレート、カルボキシメチルエチルセルロースなど）などで剤皮を施してもよい。
- カプセル剤として製造する場合には、適当な賦形剤、例えば流動性と滑沢性を向上させるためのステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、軽質無水ケイ酸など、また加圧流動性のための結晶セルロースや乳糖などの他、上記崩壊剤などを適宜添加したものを均等に混和または粒状もしくは粒状としたものに適当なコーティング剤で剤皮を施したものを充填するか、適当なカプセル基剤（ゼラチンなど）にグリセリンまたはソルビトールなど加えて塑性を増したカプセル基剤で被包成形することもできる。これらカプセル剤には必要に応じて、着色剤、保存剤〔二酸化イオウ、パラベン類（パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル）〕などを加えることができる。カプセル剤は通常のカプセルの他、腸溶性コーティングカプセル、胃内抵抗性カプセル、放出制御カプセルとすることもできる。腸溶性カプセルとする場合、腸溶性コーティング剤でコーティングした化合物または化合物に上記の適当な賦形剤を添加したものを通常のカプセルに充填または、カプセル自身を腸溶性

コーティング剤でコーティング、もしくは腸溶性高分子を基剤として成形することができる。

坐剤として製造する場合には坐剤基剤（例えばカカオ脂、マクロゴールなど）を適宜選択して使用することができる。

- 5 シロップ剤として製造する場合、例えば安定剤（エデト酸ナトリウムなど）、懸濁化剤（アラビアゴム、カルメロースなど）、矯味剤（単シロップ、ブドウ糖など）、芳香剤などを適宜選択して使用することができる。

- 注射剤、点眼剤または点鼻剤として製造する場合、医薬上許容される添加物、例えば等張化剤（塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、
10 ソルビトール、ホウ酸、ホウ砂、ブドウ糖、プロピレングリコールなど）、緩衝剤（リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸緩衝液、イプシロンアミノカプロン酸緩衝液など）、保存剤（パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂など）、増
15 粘剤（ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールなど）、安定化剤（亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエンなど）、pH調整剤（塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸など）などを適宜添加した溶液に溶解または分散することによって製造することができる。

- 上記シロップ剤、注射剤、点眼剤および点鼻剤における添加剤の添加量は、添加する添加剤の種類、用途などによって異なるが、添加剤の目的を達成し得る濃度を添加すればよく、等張化剤は、通常、浸透圧が約229～約343 mOsm
25 となるよう、約0.5～約5.0 w/v %を添加する。また、緩衝剤は約0.01～約2.0 w/v %程度、増粘剤は約0.01～約1.0 w/v %程度、安定化剤は約0.001～約1.0 w/v %程度添加する。pH調整剤は、適宜添加

し、通常 pH 約 3～約 9、好ましくは約 4～約 8 になるように添加する。

本発明化合物の投与量は対象となる疾患、症状、投与対象、投与方法などにより異なるが、例えば内服剤として成人に投与する場合は、1 日数回、1 回量約 1～約 200 mg、好ましくは約 10～100 mg である。また、注射剤として成人に投与する場合は、1 日 1 回、約 0.1～約 50 mg、好ましくは約 1～約 30 mg である。また、局所的に目に使用する場合には、本発明化合物を通常約 0.001～約 1.0 w/v %、好ましくは約 0.01～約 0.5 w/v % 含有する点眼液を、1 回約 20～約 50 μ L、1 日数回点眼するのがよい。

10 発明を実施するための最良の形態

本発明を以下の参考例、実施例、試験例および製剤例に従いさらに詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

なお、実施例で述べる化合物の分析値において、融点は Y a n a c o 社製 MP-500 V 型（補正なし）を用いて測定した。核磁気共鳴スペクトル（NMR）は日本電子製 J N M - G S X 270 型（270 MHz）および V a r i a n 製 G e m i n i 2000 型（300 MHz）を用いて測定した。比旋光度（ $[\alpha]_D$ ）は H o r i b a 製 S E P A - 2000 型を用いて測定した。元素分析は P e r k i n E l m e r 製 C H N S / O 2400 型を用いて測定した。

参考例 1 N-（（4-フルオロフェニル）スルホニル）-L-バリル-L-ロイシナール（参考化合物 1）

ステップ 1：バリン（11.7 g, 100 mmol）を 1 M 水酸化ナトリウム水溶液（100 mL）に溶解し、さらに精製水（150 mL）とテトラヒドロフラン（100 mL）を加え、氷冷下で攪拌しながら、1 M 水酸化ナトリウム水溶液（100 mL）と 4-フルオロベンゼンスルホニルクロリド（17.5 g, 90 mmol）のテトラヒドロフラン溶液（100 mL）を同時に滴下した。この溶液を室温で 18 時間攪拌し、反応させた。反応終了後、反応液を pH 2～3 に調整して酢酸エチルで抽出した。抽出液を希塩酸、飽和食塩水で洗浄後、無水硫

酸マグネシウムで脱水した。酢酸エチルを減圧留去して、残渣をヘキサン-酢酸エチル混液（酢酸エチル 1 容量に対しヘキサンを約 10 ～ 約 20 容量の割合で混合した溶液、以下ヘキサン-酢酸エチル混液というときは同様である。）で洗浄し、N-（（4-フルオロフェニル）スルホニル）-L-バリン（15.5 g, 56%）を白色結晶として得た。

ステップ 2 : N-（（4-フルオロフェニル）スルホニル）-L-バリン（15.0 g, 55 mmol）と N-ヒドロキシコハク酸イミド（7.6 g, 66 mmol）をテトラヒドロフラン（200 mL）に溶解し、氷冷下で攪拌しながら 1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（12.6 g, 66 mmol）のジクロロメタン溶液（200 mL）をゆっくりと加えた。この溶液を室温で約 4 時間攪拌し、反応させた。反応終了後、溶媒を減圧留去して残渣を酢酸エチルに溶解し、希塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。酢酸エチルを減圧留去して、残渣をヘキサン-酢酸エチル混液で洗浄し、N-（（4-フルオロフェニル）スルホニル）-L-バリン N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル（17.6 g, 87%）を白色結晶として得た。

ステップ 3 : N-（（4-フルオロフェニル）スルホニル）-L-バリン N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル（2.0 g, 5.4 mmol）をジクロロメタン（50 mL）に溶解し、ロイシノール（0.82 g, 7.0 mmol）を加えた。この溶液を 2 時間攪拌し、反応させた。反応終了後、希塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。ジクロロメタンを減圧留去して、残渣をヘキサン-酢酸エチル混液で洗浄し、N-（（4-フルオロフェニル）スルホニル）-L-バリン-L-ロイシノール（1.9 g, 94%）を白色結晶として得た。

ステップ 4 : N-（（4-フルオロフェニル）スルホニル）-L-バリン-L-ロイシノール（1.8 g, 4.8 mmol）をジメチルスルホキシド（20 mL）とジクロロメタン（10 mL）に溶解しジイソプロピルエチルアミン（2.

5 g, 19 mmol) を加えた。この溶液を室温で攪拌しながら三酸化硫黄ピリジン錯体 (3.1 g, 19 mmol) のジメチルスルホキシド溶液 (15 mL) を加え、さらに40分間攪拌した。反応終了後、酢酸エチルを加え、希塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで脱水した。溶媒を減圧留去して、残渣を酢酸エチルから再結晶を行い、参考化合物 1 (1.1 g, 60%) を白色結晶として得た。

mp 157 °C. ¹H-NMR (270MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.74 (d, 3H, *J* = 5.9 Hz), 0.80 (d, 6H, *J* = 6.4 Hz), 0.85 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 1.14-1.46 (m, 3H), 1.81-1.93 (m, 1H), 3.56-3.62 (dd, 1H, *J* = 6.6, 9.5 Hz), 3.80-3.88 (m, 1H), 7.33-7.42 (m, 2H), 7.79-7.86 (m, 2H), 7.96 (d, 1H, *J* = 9.8 Hz), 8.27 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 9.14 (s, 1H). Anal. Calcd for C₁₇H₂₅FN₂O₄S : C, 54.82 ; H, 6.77 ; N, 7.52. Found : C, 54.82 ; H, 6.76 ; N, 7.57. $[\alpha]_D^{25} +8.99^\circ$ (c = 0.20, DMSO).

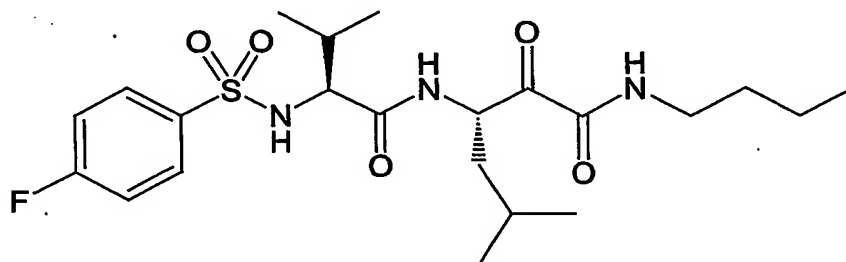
参考例 2 (3S) -N-ブチル-3-((2S)-2-(((4-フルオロフェニル)スルホニル)アミノ)-3-メチルブタノイルアミノ)-2-ヒドロキシ-5-メチルヘキサナミド (参考化合物 2)

参考化合物 1 (4.0 g, 11 mmol)、n-ブチルイソシアニド (1.0 g, 12 mmol) およびピリジン (3.4 g, 43 mmol) のジクロロメタン溶液 (100 mL) に氷冷下でトリフルオロ酢酸 (2.4 g, 21 mmol) を滴下した。この溶液を室温で18時間攪拌した。減圧濃縮後、残渣を酢酸エチルに溶解し、この溶液を1M塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧濃縮した。この残渣をHPLCシステム (カラム ; YMC Pack ODS-A 250 × 20 mm I.D., 移動相 ; アセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸 = 40 : 60 : 0.1) で精製を行い、参考化合物 2 (1.0 g, 20%) を無色結晶として得た。

mp 192.3-194.2 °C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.69 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 0.70 (d, 3H, *J* = 5.4 Hz), 0.75 (d, 3H, *J* = 6.0 Hz), 0.79 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz), 0.85 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz), 0.94 (m, 1H), 1.05-1.09 (m, 2H), 1.18-1.27

(m, 2H), 1.30–1.39 (m, 2H), 1.82 (m, 1H), 2.92–3.07 (m, 2H), 3.63 (dd, 1H, $J = 9.2, 5.7$ Hz), 3.72 (dd, 1H, $J = 6.0, 2.6$ Hz), 3.93 (m, 1H), 5.65 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 7.31–7.36 (m, 3H), 7.53 (t, 1H, $J = 5.9$ Hz), 7.59 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz), 7.80–7.85 (m, 2H).

- 5 実施例1 (3S)-N-ブチル-3-((2S)-2-((4-フルオロフェニル)スルホニル)アミノ)-3-メチルブタノイルアミノ)-5-メチル-2-オキソヘキサナミド (化合物1)



- 参考化合物2 (1.0 g, 2.1 mmol) のジクロロメタン溶液 (100 mL) にデスマーチン試薬 (Desmarchin periodinane) (1.3 g, 3.2 mmol) を加えた。この溶液を室温で18時間攪拌した。さらに、10%チオ硫酸ナトリウム水溶液 (50 mL) および10%炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL) を加え、10分間攪拌した。有機層を分離し、1M塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧濃縮した。残渣をヘキサン/酢酸エチル溶液から結晶化し化合物1 (0.80 g, 80%) を無色結晶として得た。
- 15

mp 107.6–109.9 °C. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.73 (d, 3H, $J = 5.7$ Hz), 0.79–0.88 (m, 12H), 1.15–1.45 (m, 7H), 1.82 (m, 1H), 3.04–3.11 (m, 2H), 3.59 (m, 1H), 4.75 (m, 1H), 7.33–7.39 (m, 2H), 7.78–7.83 (m, 2H), 7.88 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz), 8.15 (d, 1H, $J = 6.3$ Hz), 8.65 (t, 1H, $J = 5.9$ Hz). Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_5\text{SF}$: C, 56.03 ; H, 7.27 ; N, 8.91. Found : C, 55.99 ; H, 7.00 ; N, 8.91.

20

試験例1 μ -カルパインおよびm-カルパイン阻害活性の測定

μ -およびm-カルパインの阻害活性は文献[Anal. Biochem. vol. 208, 387-392 (1993)]に記載された方法に準じて測定した。すなわち、種々の濃度の被験薬を含むジメチルスルホキシド溶液(2.5 μ L)に、0.5 mg/mLのカゼイン、50 mMのトリス塩酸緩衝液(pH 7.4)、20 mMのジチオスレイトールおよび1.0 nmolの μ -カルパイン(ヒト赤血球由来、Cosmo Bio社製)またはm-カルパイン(ブタ腎臓由来、Cosmo Bio社製)を含む反応液(200 μ L)を96ウェルプレート上で加えた。そこへ、20 mMの塩化カルシウム水溶液(50 μ L)を加え、30℃で60分間反応させた。この反応液(100 μ L)を別の96ウェルプレートに移し、精製水(50 μ L)と50%のProtein Assay Dye Reagent(BIO-RAD Catalog 500-0006)水溶液(100 μ L)を加えて室温で15分間放置した後、595 nmで吸光度を測定した。被験薬を含まず同様に処理したものをコントロール値、20 mM塩化カルシウム水溶液の代わりに1 mM EDTA水溶液(50 μ L)を加え同様に処理したものをブランク値とし、50%阻害に必要な量(IC₅₀)を求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{ 1 - (\text{測定値} - \text{ブランク値}) / (\text{コントロール値} - \text{ブランク値}) \} \times 100$$

試験結果1

その結果を表1に示した。

表1. 本発明化合物の μ -カルパインおよびm-カルパイン阻害活性

被験薬 (化合物番号)	50%酵素阻害濃度 [IC ₅₀ (μ M)]	
	μ -カルパイン	m-カルパイン
1	0.021	0.021

その結果、本発明化合物には、優れたカルパイン阻害活性が認められた。

試験例2 Caco-2を用いた透過性試験

Caco-2細胞(ATCC HTB-37; Manassas, VA, USA)をTranswell(Costar社製、ポリカーボネートフィルター、孔径0.4 μ m、培養面積

- 0.33 cm²) に 0.5×10^6 cell/cm² になるよう播種した。細胞単層膜はダルベッコ改変イーグル最小必須培地 (DMEM、Fisher Scientific 社製) 中、21日から30日間培養することにより作成した (37℃、5%CO₂、95%RH)。細胞のコンフルエント化は細胞上下間抵抗 (TEER) を測定することにより確認した。頂端膜側に化合物1が10 μMとなるよう添加したHank's Balanced Salt Solution (HBSS、Fisher Scientific 社製) を、基底膜側にHBSSを加え、30分および60分後の基底膜側の化合物1濃度および60分後の頂端膜側の化合物1濃度を高速液体クロマトグラム法 (HPLC) で定量した。HPLCによる定量結果から、見かけの透過係数 (P_{app}) を下記の式より算出した。

$$P_{app} = (\delta Q / \delta t) \times (1 / 60 A C_0)$$

P_{app} : 見かけの透過係数 (cm/sec)

$\delta Q / \delta t$: 透過速度 (pmol/min)

A : 細胞単層膜面積 = 0.33 (cm²)

- 15 C_0 : 頂端膜側の初濃度 (pmol/mL)

試験結果 2

化合物1の見かけの透過係数 (P_{app}) は 1.7×10^{-5} (cm/sec) であった。

製剤例 1 錠剤

20	化合物1	5 g
	デンプン	12 g
	乳糖	27.2 g
	ステアリン酸マグネシウム	0.4 g

- 化合物1、乳糖およびデンプンを加えてよく混和し、湿性錠剤調整法に準じて打錠用顆粒とする。ステアリン酸マグネシウムを加えて打錠し、錠剤400錠とする。錠剤は、必要に応じて、腸溶性コーティング剤 (メタアクリル酸コポリマー) でコーティングする。

製剤例 2 点眼剤

	化合物 1	1 0 0 m g
	ホウ酸	7 0 0 m g
	ホウ砂	適量
5	塩化ナトリウム	5 0 0 m g
	エデト酸ナトリウム	0 . 0 5 m g
	塩化ベンザルコニウム	0 . 0 0 0 5 m g
	滅菌精製水	全量 1 0 0 m L

以上の成分を常法により無菌的に混和して点眼剤とする。

10 製剤例 3 注射剤

	化合物 1	1 0 0 m g
	塩化ナトリウム	9 0 0 m g
	1 N水酸化ナトリウム	適量
	注射用蒸留水	全量 1 0 0 m L

15 以上の成分を常法により無菌的に混和して注射剤とする。

産業上の利用可能性

本発明の一般式 (I) で表される化合物は、優れたカルパイン阻害活性を有しているため、カルパインが関与する種々の疾患、例えば虚血性疾患、免疫疾患、
 20 アルツハイマー病、骨粗鬆症、脳組織障害による疾患、白内障、緑内障、網膜疾患、網脈絡膜疾患、光凝固による眼球後眼部合併症、血管新生を伴う疾患などの予防および治療薬として有用である。

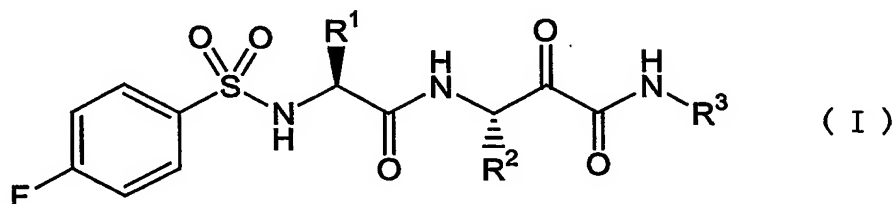
以上、本発明の具体的な態様のいくつかを詳細に説明したが、当業者であれば
 25 示された特定の態様には、本発明の新規な教示と利点から実質的に逸脱しない範囲で色々な修正と変更をなし得ることは可能であるので、そのような修正および変更も、全て後記の特許請求の範囲で定義される本発明の精神と範囲内に含まれ

るものである。

本出願は、日本で出願された特願 2002-212288 号を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. 一般式 (I)



[式中、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ低級アルキル基を示す。]

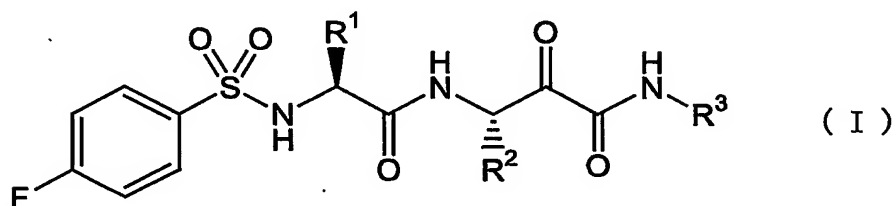
5 化合物。

2. R^1 、 R^2 および R^3 がそれぞれ炭素数3または4のアルキル基である請求の範囲1記載の化合物。

3. (3S)-N-ブチル-3-((2S)-2-((4-フルオロフェニル)スルホニル)アミノ)-3-メチルプタノイルアミノ)-5-メチル-2-オキソヘキサナミド。

10

4. 一般式 (I)



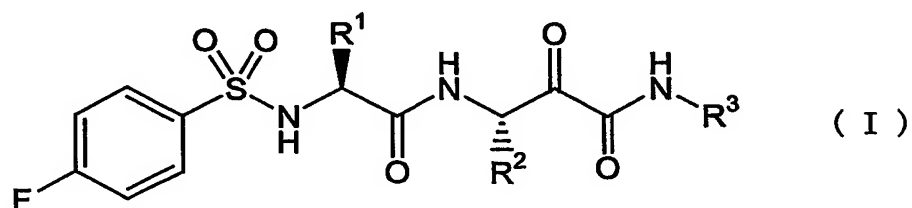
[式中、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ低級アルキル基を示す。] で表される化合物を含有する医薬。

15 5. カルパイン阻害剤である請求の範囲4記載の医薬。

6. カルパインが関与する疾患の予防または治療剤である請求の範囲4記載の医薬。

7. 一般式 (I)

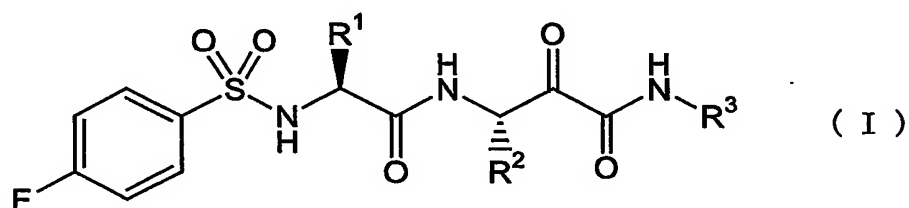
18



[式中、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ低級アルキル基を示す。] で表される化合物および製薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物。

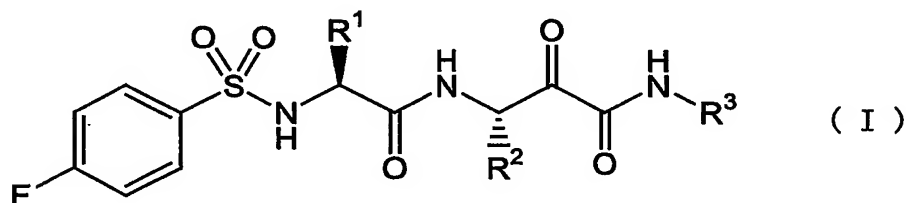
8. カルパイン阻害剤である請求の範囲7記載の医薬組成物。

- 5 9. カルパインが関与する疾患を治療する方法であって、治療を必要とする哺乳動物に有効量の一般式 (I)



[式中、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ低級アルキル基を示す。] で表される化合物を投与することからなる方法。

- 10 10. カルパイン阻害剤としての一般式 (I)



[式中、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ低級アルキル基を示す。] で表される化合物の使用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07C311/19, A61K31/18, A61P7/02, 9/00, 9/10, 19/02, 19/10, 25/00, 25/28, 27/02, 27/06, 27/12, 37/02, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07C311/19, A61K31/18, A61P7/02, 9/00, 9/10, 19/02, 19/10, 25/00, 25/28, 27/02, 7/06, 27/12, 37/02, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6057290 A1 (SENJU PHARMACEUTICAL Co., Ltd.), 02 May, 2000 (02.05.00), Full text & EP 928786 A1 & JP 2001-233847 A	1-8, 10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 August, 2003 (28.08.03)

Date of mailing of the international search report
16 September, 2003 (16.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08878

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 9

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 9 pertains to method for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07C311/19, A61K31/18, A61P7/02, 9/00, 9/10, 19/02, 19/10, 25/00, 25/28, 27/02, 27/06, 27/12, 37/02, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07C311/19, A61K31/18, A61P7/02, 9/00, 9/10, 19/02, 19/10, 25/00, 25/28, 27/02, 27/06, 27/12, 37/02, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)
REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 6057290 A1 (SENJU PHARMACEUTICAL Co., Ltd.) 2000.05.02, 全文 & EP 928786 A1 & JP 2001-233847 A	1-8, 10

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.08.03

国際調査報告の発送日

16.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

穴吹 智子

4H

3235

電話番号 03-3581-1101 内線 3441

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
治療による人体の処置方法に関するものであり、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。